

PATENT
0020-4710P

IN THE U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant: Masaya YAMANOUCHI et al.
Appl. No.: 09/578,693 Group: Unknown
Filed: May 26, 2000 Examiner: UNKNOWN
For: METHOD FOR EXAMINING KIDNEY DISEASES

L E T T E R

Assistant Commissioner for Patents
Washington, DC 20231

July 26, 2000

Sir:

Under the provisions of 35 U.S.C. § 119 and 37 C.F.R. § 1.55(a), the applicant(s) hereby claim(s) the right of priority based on the following application(s):

<u>Country</u>	<u>Application No.</u>	<u>Filed</u>
JAPAN	9-323684	November 26, 1997

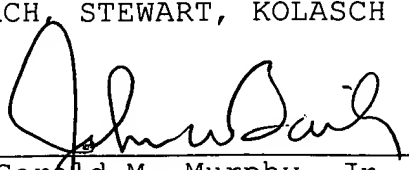
A certified copy of the above-noted application(s) is(are) attached hereto.

If necessary, the Commissioner is hereby authorized in this, concurrent, and future replies, to charge payment or credit any overpayment to Deposit Account No. 02-2448 for any additional fee required under 37 C.F.R. §§ 1.16 or 1.17; particularly, extension of time fees.

Respectfully submitted,

BIRCH, STEWART, KOLASCH & BIRCH, LLP

By

 #32,821
Gerald M. Murphy, Jr., #28,977

Cam
GMM/CAM/jao
0020-4710P

P.O. Box 747
Falls Church, VA 22040-0747
(703) 205-8000

Attachment

Birch, Stewart, Kolasek + Birch,
Application No. 09/578,693 LLP
Docket No. 0020-4710P
Filed: May 26, 2000
Applicants: M. Yamone et al.

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT



別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1997年11月26日

出 願 番 号

Application Number:

平成 9 年特許願第 3 2 3 6 8 4 号

出 願 人

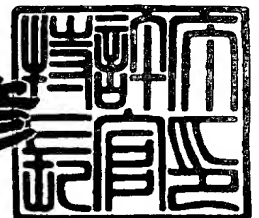
Applicant (s):

田辺製薬株式会社

2000年 6月 2日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近 藤 隆 彦



出証番号 出証特2000-3040888

【書類名】 特許願

【整理番号】 A00-4574

【提出日】 平成 9年11月26日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12Q 1/00
A61B 5/00
G01N 33/00

【発明の名称】 腎疾患の検査方法

【請求項の数】 15

【発明者】

 【住所又は居所】 滋賀県草津市渋川1-1-30 ローレルコート草津9 1
7号

 【氏名】 山之内 昌也

【発明者】

 【住所又は居所】 大阪府豊中市蛸池東町2丁目4-8-805

 【氏名】 本田 章子

【発明者】

 【住所又は居所】 京都府向日市上植野町堂の前5丁目3-616

 【氏名】 内田 裕美

【発明者】

 【住所又は居所】 兵庫県伊丹市北本町1丁目110-1-3-601

 【氏名】 菅谷 健

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都練馬区谷原5-15-4

 【氏名】 木村 健二郎

【特許出願人】

 【識別番号】 000002956

 【氏名又は名称】 田辺製薬株式会社

【代理人】

【識別番号】 100076923

【弁理士】

【氏名又は名称】 箕浦 繁夫

【電話番号】 06-300-2726

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 016322

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9707174

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 腎疾患の検査方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ゲッ歯類以外の哺乳動物から採取した被検試料中に存在する、腎臓組織由来の脂肪酸結合蛋白質を検出することを特徴とする、腎疾患の検査方法。

【請求項2】 腎臓組織由来の脂肪酸結合蛋白質が、肝型脂肪酸結合蛋白質である請求項1記載の検査方法。

【請求項3】 腎臓組織が、腎臓の近位細尿管の組織である請求項1記載の検査方法。

【請求項4】 被検試料が、腎組織又は尿である請求項1記載の検査方法。

【請求項5】 ゲッ歯類以外の哺乳動物がヒトである請求項1記載の検査方法。

【請求項6】 正常な腎臓組織を有する動物から採取した対照試料における検出結果と比較する工程を含む請求項1記載の検査方法。

【請求項7】 脂肪酸結合蛋白質の検出を脂肪酸結合蛋白質に特異的に結合する抗体を用いて行う請求項1記載の検査方法。

【請求項8】 脂肪酸結合蛋白質に特異的に結合する抗体が、肝型脂肪酸結合蛋白質に特異的に結合する抗体である請求項7記載の検査方法。

【請求項9】 脂肪酸結合蛋白質に特異的に結合する抗体が、心筋型脂肪酸結合蛋白質と実質的に交差反応しないものである請求項8記載の検査方法。

【請求項10】 ラット及びマウスから選択されるゲッ歯類から採取した被検試料中の、 α_{2U} -グロブリンもしくは腎臓組織由来の脂肪酸結合蛋白質を検出し、正常動物から採取した被検試料と比較した場合の減少の度合いを決定することからなる、 α_{2U} -グロブリン腎症以外のゲッ歯類の腎疾患の検査方法。

【請求項11】 脂肪酸結合蛋白質が腎型脂肪酸結合蛋白質である請求項10記載の検査方法。

【請求項12】 被検試料が腎組織、尿又は血液である請求項10記載の検査方法。

【請求項13】 腎疾患が抗GBM腎炎モデルである請求項10記載の検査方法。

【請求項14】 請求項1～13記載の検査方法に使用するための検査用試薬又はキット。

【請求項15】 脂肪酸結合蛋白質に特異的に結合する抗体を含有してなる請求項14記載の検査用試薬又はキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、腎疾患の予後診断等のための検査方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

慢性腎炎などの腎疾患は一般に複雑で多様な病態を呈するが、早く適切な処置を行い、人工透析が必要となる慢性腎不全への移行を回避するか、できるだけ移行を遅らせることが重要な課題となる。腎疾患の初期症状から慢性腎不全へと移行する場合、臨床的には、持続的高度蛋白尿や高血圧などが、組織学的には、糸球体硬化と並んで最近では間質の線維化などが、予後不良を規定する所見として重要であるといわれている。しかしながら、腎疾患の予後を的確に診断するための決定的な方法は未だ確立されていないのが現状であり、有用な診断及び検査方法が望まれている。

【0003】

一方、脂肪酸結合蛋白質（FABP：fatty acid binding protein）は、サイトゾルに存在して脂肪酸と結合する能力を有する分子量約15キロダルトン前後の蛋白質群である。それらの生理機能については、脂肪酸の細胞内転送や蓄積によって代謝酵素系の調節に関与していると考えられているが詳細は不明である。FABPとしては、肝型（L-FABP）、腸型（I-FABP）、心筋型（H-FABP）、脳型（B-FABP）、皮膚型（C-FABP/E-FABP）、脂肪細胞型（aP2）、末梢神経細胞型（ミエリンP2）等少なくとも7つの分子種が知られており、その一次構造が決定されている。これらはいずれも脂肪酸結合能を有し、一部に配列がよく保存された

領域が認められること等から共通の祖先遺伝子から進化したファミリーであると考えられているが、全体としては互いに異なる一次構造を有し、各々特異的な組織分布を示す。FABPの命名は、初めにどの組織から見出されたかを意味し、その組織にしか存在しないことを必ずしも意味するものではない。

【0004】

FABPに着目した診断方法としては以下のようなものが知られている。特開平4-31762には、心筋梗塞の診断のために、ヒト心筋組織由来のH-FABPの血清中や尿中レベルを、抗体を用いた免疫測定法で定量することが記載されている。また、W093/08276およびKandaらの報告（Gastroenterology 第110巻、第339-343頁、1996年）には、小腸虚血時などに血清中のI-FABPレベルが著しく高くなることからI-FABPが腸疾患の診断マーカーとして有用であることが記載されている。しかし、これらは腎疾患とは関連しないし、虚血時の組織傷害に伴って漏出するFABPを指標として検出するものであって組織における発現に着目したものではない。

【0005】

最近、山崎らは、大腸癌及びその転移巣におけるL-FABPの発現が癌の悪性度や予後と関連性があり、L-FABPの発現量が高いほど予後良好であることを報告している（第47回大腸癌研究会要旨集、第42頁、1997年）。しかし、これは大腸癌という特異な組織に関する知見である。

【0006】

さらに、雄性ラットの腎臓に存在する腎型FABPは α_{2U} -グロブリンに由来することが知られているが、特開平5-33025には、化学物質の投与により雄性ラットに誘発される α_{2U} -グロブリン腎症の診断のために、尿中の α_{2U} -グロブリンの増加を測定することが記載されている。しかし、これは α_{2U} -グロブリンが著しく蓄積することが知られている特定の腎症モデルのための方法にすぎない。

【0007】

このように、腎組織におけるFABPと腎疾患との関連及びこれに着目した診断や検査方法は知られていなかった。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、腎疾患の診断のために有用な検査方法を提供することにある。

【0009】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、腎組織に由来する脂肪酸結合蛋白質に着目した研究の結果、腎組織中における脂肪酸結合蛋白質の発現と腎疾患の予後との間に関連性があることを独自に見出し、本発明を完成するに至った。

【0010】

すなわち、本発明は、ゲッ歯類以外の哺乳動物から採取した被検試料中に存在する、腎臓組織由来の脂肪酸結合蛋白質を検出することを特徴とする、腎疾患の検査方法である。

【0011】

また、本発明は、ラット及びマウスから選択されるゲッ歯類から採取した被検試料中の、 α_{2U} -グロブリン (Major Urinary Proteinとも称される) もしくは腎臓組織由来の脂肪酸結合蛋白質を検出し、正常動物から採取した被検試料と比較した場合の減少の度合いを決定することからなる、 α_{2U} -グロブリン腎症以外のゲッ歯類の腎疾患の検査方法である。

【0012】

また、これら検査方法に使用するための検査用試薬又はキットである。

【0013】

本発明の検査方法が適用されるゲッ歯類以外の哺乳動物としては、例えば、ヒトの他、ウサギ、サル、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ヒツジ、ヤギ、ブタ等が挙げられる。その中でも好ましくはヒト、ウサギ、ブタに適用され、とりわけ、ヒトに好適に適用される。

【0014】

腎臓組織中では少なくとも二種類の脂肪酸結合蛋白質が発現しており、一つは肝臓型であり、もう一つは心筋型であることが、ヒト腎臓について報告されてい

る (Maatmanら、Biochemical Journal、第288巻、第285-290頁、1992年)。また、これらのうち肝臓型は近位尿細管に分布し、心筋型は主として遠位尿細管に分布していることが知られている (Maatmanら、Biochemical Journal、第273巻、第759-766頁、1991年)。また、発明者らは、後記実施例6で示した通り、ウサギ腎臓においても、これら二種類の脂肪酸結合蛋白質が存在していることを見出している。

【0015】

上記のことから、ゲッ歯類以外の哺乳動物において、腎臓組織由来の脂肪酸結合蛋白質 (以下、FABP) としては、肝臓型脂肪酸結合蛋白質 (以下、L-FABP) 及び心筋型脂肪酸結合蛋白質 (以下、H-FABP) が挙げられる。

【0016】

これらのうち、L-FABPは近位尿細管に分布しているが、発明者らの知見によれば、このL-FABPの発現は、腎疾患の予後と密接に関連しており、その発現量が多いほど予後は良好であると判断される。

【0017】

一方、ラットの腎臓においても複数種のFABPが存在し、一つはH-FABPで遠位尿細管に分布している。しかし、腎型FABP (K-FABP) と称されるもう一つのFABPは、雄性ラットに特異的な尿中主要蛋白質として知られていた α_{2U} -グロブリンの少なくともN末端側9アミノ酸残基が欠失したものであることが明らかにされている (Kimuraら、FEBS Letters、第246巻、第101-104頁、1989年)。 α_{2U} -グロブリンは、肝臓で合成されて血中に放出された後、腎臓を經由して尿中に排出されるが、興味深いことに、その一部は腎臓の尿細管細胞内に再吸収され、細胞内でプロセッシングを受けて腎型FABPに変換されると考えられている (Kimuraら、1989年)。発明者らは、雄性マウスにおいても、K-FABPが近位尿細管に分布していることを見出している。この他、ラット腎臓には、ごく少量L-FABPも存在することが知られているが、ヒトとは異なって近位尿細管より遠位尿細管に多く分布しているとされている (Maatmanら、Biochemical Journal、第288巻、第285-290頁、1992年)。

【0018】

上記のことから、ゲッ歯類（ラットおよびマウス）の腎臓組織に由来するFABPとしては、H-FABP、L-FABP、及びK-FABPが挙げられる。これらのうち α_{2U} -グロブリンもしくはこれに由来するK-FABPについて、発明者らは、その発現量が腎疾患の予後と密接に関連していることを見出しており、発現量が多いほど予後は良好であると判断される。従って、本発明の検査方法をゲッ歯類（ラット及びマウス）に適用する場合には、 α_{2U} -グロブリンもしくはK-FABPを検出する方法を用いることができる。

【0019】

本発明に適用される被検試料としては、腎組織のほか、尿、血液（血漿又は血清）、腎組織からの抽出液等が挙げられる。これらのうち、特に腎組織、尿が好適な被検試料である。腎組織としては、より具体的には、腎生検等により採取された腎臓組織の切片等が挙げられる。

【0020】

【発明の実施の形態】

被検試料中のFABP（もしくは α_{2U} -グロブリン）の検出は、これと特異的に結合する抗体を用いる免疫化学的方法により好適に実施できる。

【0021】

抗体は、免疫抗原として、例えば精製したFABP（もしくは α_{2U} -グロブリン）を用いて調製できる。

【0022】

FABPの各分子種については、すでにその臓器分布、分子量、一次構造などが報告されている（藤井ら、動脈硬化、第24巻、第353-361頁、1996年； Veerkamp and Maatman、Prog.Lipid Res.、第34巻、第17-52頁、1995年）。また、 α_{2U} -グロブリンについても知られている（Drickamerら、J.Biol.Chem.、第256巻、第3634-3636頁、1981年； UntermanらProc.Natl.Acad.Sci.USA、第78巻、第3478-3482頁）。従って精製は、これらの情報をもとに実施できる。

【0023】

FABPは、目的とする分子種のFABPが分布していると考えられる臓器組

織から精製できる。例えば、L-FABPであれば、肝臓又は腎臓などから、またH-FABPであれば、心臓又は腎臓などから精製できる。ラット又はマウスの α_{2U} -グロブリンは、肝臓、血液、尿から、またK-FABPは、腎臓から精製できる。精製は、Kelvinらの文献(J.Biol.Chem., 第263巻、第15762-15768頁、1988年)記載の方法などに準じて実施できる。すなわち、摘出した臓器をホモジナイズした後、超遠心して得られる細胞質画分を、ゲルろ過および陰イオン交換クロマトグラフィーなどにより分画し、分子量や脂肪酸結合活性を指標としてFABPを含有する画分を選択して精製する。さらに、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動を行い、精製を加えるか、または単一バンドとなっていること確認することができる。精製蛋白質について、アミノ酸組成やN末端側アミノ酸配列を決定し、報告された組成や配列と比較することにより、目的とする分子種であることを確認できる。

【0024】

FABP (もしくは α_{2U} -グロブリン) の脂肪酸結合活性は、例えば、ANS (1-anilinonaphthalene-8-sulfonic acid) (Polysciences 社製) 等の蛍光プローブを用いて容易に測定できる。これら蛍光プローブはFABPの脂質結合部位など疎水性の高い領域と結合することにより蛍光強度が上昇する。例えば、FABPを含む溶液にANSを添加混合した後、蛍光強度(励起波長372nm; 蛍光波長480nm)を測定すればよい。その他、RI標識した脂肪酸を用いることによってもFABP (もしくは α_{2U} -グロブリン) の脂肪酸結合活性を測定することができる(Kimuraら、FEBS Letters、第246巻、第101-104頁、1989年)。

【0025】

また、L-FABPおよびH-FABPについては、ヒト、マウス、ブタ、ウシ、ラット間でホモロジーが高く、アミノ酸レベルで90%以上であることが知られているので、ヒトのL-FABPと結合する抗体を得るために、例えばマウスL-FABPを抗原として用いることもできる。この場合、抗原の調製が容易であるという利点がある。

【0026】

抗原として用いるFABP (もしくは α_{2U} -グロブリン) は、天然(例、肝臓

、腎臓等の各組織）由来のものでもよいが、遺伝子工学的手法によって製造された組換え型蛋白質であってもよい。FABPのアミノ酸配列や遺伝子配列は既に報告されている（Veerkamp and Maatman, Prog.Lipid Res., 第34巻、第17-52頁、1995年）ので、例えば、それらをもとにプライマーを設計し、PCR（polymerase chain reaction）法により適当なcDNAライブラリ等からcDNAをクローニングし、これを用いて遺伝子組換え技術より、組換えFABPを調製することができる。

【0027】

また、抗原として、FABPのその断片、またはその部分配列を有する合成ペプチド等を、必要に応じてキャリア高分子物質（牛血清アルブミン、ヘモシアニン等）と結合させて用いることもできる。

【0028】

FABPもしくは α_{2U} -グロブリンと特異的に結合する抗体は、抗血清、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体等いずれであってもよい。

【0029】

抗体は、高い特異性を有するものが好ましく、例えば、抗L-FABP抗体であれば、H-FABPとは実質的に交差反応しないことが望ましい。より特異性の高い抗体を取得するためには、より高度に精製され純度の高い抗原を用いることが望ましい。

【0030】

抗体の調製に際しては、温血動物に、前記のごとく調製した精製抗原（例えば精製FABP等）を接種して免疫する。免疫する温血動物としては、哺乳動物（ウサギ、ヒツジ、ラット、マウス、モルモット、ウマ、ブタなど）、鳥類（ニワトリ、アヒル、ガチョウなど）が挙げられる。ウサギの場合、例えば、抗原100 μ g～1mg程度を約1mlの生理食塩水及びフロイントの完全アジュバント中に乳化したものを、背部又は後肢掌皮下に接種し、2回目以降はアジュバントをフロイントの不完全アジュバントにかえて、これを2～4週間おきに3～8回接種して免疫し、最終接種の約7～12日後に使用する。マウスの場合、1回あたり10～30 μ g/匹の抗原を、通常、皮下、腹腔内、静脈内に、約2週間隔で3～8回接種

して免疫し、最終接種の約2～4日後に使用する。

【0031】

ポリクローナル抗体は、前記のように免疫した動物から採血し、血清（抗血清）を分取して、得られた抗血清からIg画分を回収して調製できる。例えば、抗血清からProtein Gカラムを用いるアフィニティークロマトグラフィーなどによりIgG画分を回収してポリクローナルIgGを得ることができる。

【0032】

モノクローナル抗体は、免疫動物から採取した抗体産生細胞を、不死化細胞と融合させて得られるハイブリドーマにより産生される。モノクローナル抗体のための免疫動物としてはマウス及びラットが好適に用いられる。ハイブリドーマの作製は、ケーラーおよびミルシュタインの方法（Kohler & Milstein, Nature, 第256巻、第495～897頁、1975年）に準じて以下のように実施できる。前記のように免疫した動物から抗体産生細胞（例えば脾細胞又はリンパ節細胞など）を採取し、これを適当な不死化細胞と細胞融合させる。不死化細胞としては、例えば骨髓腫細胞の細胞株（NSI-Ag4/1、Sp2/0-Ag14など）が好適に用いられる。骨髓種細胞は、それ自身が抗体又は免疫グロブリンのH鎖又はL鎖を産生しない非分泌型であることが好ましい。また、未融合の骨髓種細胞と融合したハイブリドーマとを選択培地中で選別し得るような選択マーカーを有していることが好ましい。例えば選択マーカーとして、8-アザグアニン耐性（ヒポキサンチン-グアニン-ホスホリボシルトランスフェラーゼ欠損）、チミジンキナーゼ欠損等を有する細胞株がよく使用される。

【0033】

細胞融合は、ポリエチレングリコールなど適当な融合促進剤を添加して行う。細胞融合は、不死化細胞当たり約10の抗体産生細胞の比率で行うことが好ましく、またおよそ抗体産生細胞 10^6 個/mlの細胞密度で好適に実施できる。

【0034】

融合処理した細胞を、適当に希釈した後、選択培地中で1～2週間培養する。例えば、8-アザグアニンに耐性の骨髓種細胞を用いる場合、HAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）培地中で培養すると、未融合骨髓種細胞は

死滅し、また未融合の抗体産生細胞も分裂サイクルが限られているため死滅するが、融合細胞だけは選択培地中で分裂を続け生存できる。

【0035】

選択培地中での培養後、その上清について例えばエンザイムイムノアッセイを行って目的とする抗体の有無を検出し、限界希釈法によってクローニングすることにより、目的抗原を認識するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを選択できる。選択に際しては、抗体価、抗体のクラス、サブクラス、抗原との親和性、特異性、エピトープなど好適な性質を有するハイブリドーマ（モノクローナル抗体）を選択できる。モノクローナル抗体のクラスとしては一般にIgGが好ましい。

【0036】

モノクローナル抗体産生ハイブリドーマは、例えば免疫に使用した動物の腹腔内に移植し、一定期間後腹水を採取し、それから目的のモノクローナル抗体を単離することができる。あるいは、ハイブリドーマを適当な動物細胞培養用の培地中で培養し、その培養液からモノクローナル抗体を単離することもできる。また、一旦目的のハイブリドーマを得たら、これからモノクローナル抗体をコードする遺伝子を取得し、通常の遺伝子組換え技術により適当な宿主中で目的のモノクローナル抗体を発現させ産生させることができる。

【0037】

抗体の分離・精製は、例えば、硫酸アンモニウム沈殿、ゲルクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等を必要に応じて組合せた通常の精製法に従って行うことができる。

【0038】

上記のようにして得られた抗体を用いて、免疫化学的方法により、被検試料中のFABP（もしくは α_{2U} -グロブリン）（抗原）を検出できる。

【0039】

被検試料が組織切片の場合、抗原（FABPもしくは α_{2U} -グロブリン）の検出は、公知の免疫組織染色法により実施できる。例えば、採取した腎組織から、パラフィン包埋切片を作製した後、脱パラフィンし、固定した後、一次抗体と反

応させる。これを洗浄後、ペルオキシダーゼなどの酵素で標識した二次抗体と反応させた後、発色基質などを加えて反応させた後洗浄する。或いはビオチン標識した二次抗体を用い、二次反応後ビオチン標識した酵素をストレプトアビジンとともに加え、発色基質などを加えて反応させてもよい。

【0040】

また、被検試料が、尿、血液（血漿又は血清）、腎組織からの抽出液などの場合、検出・定量は、公知のラジオイムノアッセイ（RIA）、エンザイムイムノアッセイ（EIA）、ケミルミネッセントイムノアッセイ、フルオロイムノアッセイ等の方法を採用して実施できる。より具体的には、例えば、抗体と標識抗原を用いる競合法、抗原に対する認識部位が異なる二種類のモノクローナル抗体又はポリクローナル抗体（もしくはモノクローナル抗体とポリクローナル抗体）を組合せて用いるサンドイッチEIA法等が挙げられる。これらアッセイ法においては、必要に応じて、抗原又は抗体を適当な担体（ゲル粒子、セルロース粒子、ポリアクリルアミドゲル、物理的吸着剤（ガラス、スチレン系樹脂）など）上に保持する。例えば抗原又は抗体をポリスチレン製のプレートやビーズ等の固相に吸着させて用いる固相法がよく採用される。また、検出のためには、例えばウエスタンブロッティング法を採用することもできる。

【0041】

上記のような免疫化学的方法において、抗体や抗原は必要に応じて標識したものが使用される。このような標識としては、放射性同位元素（ ^{124}I 、 ^{14}C 、 ^3H ）の他、酵素（ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ等）、発光物質（アクリジニウムエステル、イソルミノール、ルシフェリン等）、蛍光物質（フルオレッセインイソチオシアネート等）等が挙げられる。このほか、ビオチン標識とストレプトアビジンを組合せて用いる方法も採用できる。

【0042】

上記のような免疫化学的方法のほか、被検試料中のFABP（もしくは $\alpha_{2\text{U}}$ -グロブリン）を検出するためのより簡便法として、例えば、前記のようにANS（1-anilinonaphthalene-8-sulfonic acid）等の蛍光プローブを用い、脂肪酸結合活性を指標として検出することも可能である。ただし、ANSは生体試料中に

非常に多量に存在するアルブミンと強く結合するため、被検試料によっては前処理によりアルブミンを除去した後で用いる必要がある。

【0043】

本発明の検査方法のための検査用試薬としては、例えば、抗FABP抗体（FABPと特異的に結合する抗体）及びその標識物などが挙げられる。抗FABP抗体としては、抗L-FABP抗体、抗H-FABP抗体、抗K-FABP抗体が挙げられ、とりわけ抗L-FABP抗体が好適である。抗体の標識物としては、ペルオキシダーゼ等の酵素が結合された抗体（酵素標識抗体）、ビオチン化された抗体（ビオチン標識抗体）などが挙げられる。

【0044】

検査用キットとしては、例えば、ビーズやプレート（96穴マイクロプレート等）等の担体上に抗FABP抗体を、吸着／結合させたものが挙げられる。また、キットには、その他EIA等に必要となる試薬（酵素標識した二次抗体や発色基質など）が組合されて、含まれていてもよい。

【0045】

本検査方法の結果の解析方法については以下の通りである。

【0046】

ヒトなどゲシシ類以外の場合、腎組織の試料中におけるL-FABPの発現が正常腎と比較して低ければ、その度合いに応じて、予後不良であるリスクが高いと判断できる。また、L-FABPは近位尿細管に局在しているので、特に近位尿細管における発現に着目することが望ましいと考えられる。

【0047】

一方、尿中、血液中のFABPの検査結果を解析する場合、腎疾患に起因する腎組織傷害に伴って尿中に腎組織由来の蛋白質が漏出するため、これを考慮する必要がある。すなわち、腎組織傷害とパラレルな関係にあると考えられる適当な対照マーカーを設定し、尿中の対照マーカーの量に対するL-FABP量の比（L-FABPの相対量）を指標とすることができる。L-FABPの相対量が、例えば予後良好であった症例と比較して低ければ、その度合いに応じて、予後不良であるリスクが高いと判断できる。

【0048】

ラットやマウスの場合は、腎組織におけるK-FABPの発現が正常腎と比較して低ければ、その度合いに応じて、予後不良であるリスクが高いと判断できる。K-FABPもまた、ヒトにおけるL-FABPと同様、近位尿細管に局在しているので、特に近位尿細管における発現に着目することが望ましいと考えられる。また、雄では、尿中の α_{2U} -グロブリンの量が、正常固体の尿と比較して低ければ、その度合いに応じて、予後不良であるリスクが高いと判断できる。

【0049】

本発明の検査方法を実施する際には、被検試料における検査結果を、対照試料における検出結果と比較することにより、より正確に腎疾患の予後等の診断を行うことができる。対照試料としては、正常な腎臓組織を有する動物から採取した試料、例えば正常な腎組織、尿などが挙げられる。

【0050】

あるいはまた、同じ腎疾患であっても他の症状又は経過を示す症例、同じ症状であってもステージの異なる症例などを対照としてとり、これらから採取した試料を対照試料として、被検試料における検査結果と比較することができる。

【0051】

また、同じ症例であっても試料採取の時期の異なる被検試料における検査結果を比較して、経時的变化を調べて今後の経過を予測したり、薬物等の治療効果を調べることもできる。

【0052】

【実施例】

実施例1 ヒト腎組織のFABPと結合する抗体の調製(I)

(抗マウスFABP抗体の調製)

(1) 抗マウスL-FABPポリクローナル抗体

ヒトの近位尿細管に存在するFABPは、主として肝臓型FABP(L-FABP)であることが知られている。ヒトとマウスのL-FABPではホモロジーが高いので、ヒト腎組織中のL-FABPと結合する抗体として、抗マウスL-FABP抗体を用いることができる。

【0053】

そこで、抗マウスL-FABPポリクローナル抗体を調製した。抗原とするマウスL-FABPは、Takahashiらの文献(Eur.J.Biochem., 第136巻、第589-601頁、1983年)記載の方法に準じて以下のように調製した。すなわち、脱血死させたマウスから摘出した肝臓に4倍量の30mM Tris-HCl 緩衝液(pH8)を加え、ポリトン型ホモジナイザーで処理した。これを遠心分離(8000rpm、15分)し、上清をさらに超遠心(100,000 x g、90分)して、細胞質画分を得た。これをゲルろ過カラム(Sephacryl S-100HR、ファルマシア製)を用いて分画し、ANS (1-anilinonaphthalene-8-sulfonic acid) (Polysciences社製)との結合活性を指標として、脂肪酸結合活性を示す画分を回収した。得られた分子量10~20キロダルトンの画分を、10mM Tris-HCl緩衝液(pH8.5)で透析した後、陰イオン交換カラム(HiTrap Q、ファルマシア社製)を用いて500mM NaClまでの直線的濃度勾配で溶出し、ANS結合活性を示す画分を回収した。さらに再度前記と同様にしてゲルろ過カラム(Sephacryl S-100HR、ファルマシア社製)を用いて分画して、得られた各画分についてSDS-ポリアクリルアミド電気泳動を行い、約14キロダルトンの単一のバンドが認められた画分を回収して、精製マウスL-FABPを得た。

【0054】

前記で得られた精製マウスL-FABPを抗原として用い、以下のようにしてウサギを免疫し、抗マウスL-FABP抗体を得た。すなわち、精製マウスL-FABP (200 μ g / 430 μ l) にフロインド完全アジュバンド (470 μ l) を加えてエマルジョンを調製し、これをウサギの背部皮下5カ所及び大腿部4カ所に10 μ l ずつ注射した。4週間後にアジュバンドをフロインド不完全アジュバンドに変えて同量の追加免疫を行い、以後2週間後に100 μ g、さらにその2週間後に50 μ g と合計4回免疫を行った。最終免疫の1週間後に心臓採血にて血液を採取し、血清を分離して抗血清を得た。得られた抗血清から、HiTrap proteinGカラム(ファルマシア社製)を用いてIgG画分を精製し、抗マウスL-FABPポリクローナル抗体(IgG)を得た。得られた抗マウスL-FABPポリクローナル抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った結果、この抗マウスL-

FABPポリクローナル抗体は、後記実施例2と同様にして調製した組換えヒトL-FABPと結合することが確認できた。また、この抗マウスL-FABPポリクローナル抗体は、精製マウスH-FABPと交差反応しなかった。

【0055】

(2) 抗マウスH-FABPポリクローナル抗体

ヒトの遠位尿細管では、心臓型FABP (H-FABP) が存在していることが知られている。H-FABPもまたヒトとマウスとの間のホモロジーが高いので、ヒト腎組織中のH-FABPと結合する抗体として、抗マウスH-FABP抗体を用いることとし、前項(1)記載の方法に準じて、マウス心臓からH-FABPを精製し、抗マウスH-FABPポリクローナル抗体 (IgG) を取得した。

【0056】

得られた抗マウスH-FABPポリクローナル抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った結果、この抗マウスH-FABPポリクローナル抗体は、マウスH-FABPとは結合したが、精製マウスL-FABP及び組換えヒトL-FABPとは交差反応しなかった。

【0057】

実施例2 ヒト腎組織のFABPと結合する抗体の調製 (II)

(抗ヒトL-FABP抗体の調製)

(1) 組換えヒトL-FABPの精製

ヒトL-FABPのcDNAを、ヒト肝臓由来のcDNAライブラリー (クロンテック社製、Cat#HL11156 LOT#5621) からPCR (polymerase chain reaction) 法によって取得した。プライマーはDNA合成機で合成した23~27マーのオリゴヌクレオチドを用いた。プライマーの塩基配列は、Loweらの文献 (J. Biol. Chem., 第260巻、第3413-3417頁、1985年) 及び遺伝子データベース (Genbankの登録番号M10617) に記載されたヒトL-FABPの遺伝子配列を元にし、プライマーの末端には発現ベクターに挿入するための制限酵素認識部位を付加されるように設計した。得られたDNA断片 (約420塩基対) は、開始コドンの前にBamHI認識部位、終止コドンの後にBamHI認識部位を有しており、目的とする完全長の

ヒトL-FABPをコードしていた。

【0058】

前記で得られたヒトL-FABPをコードするDNA断片を制限酵素BamHIで消化し、融合蛋白質発現用ベクタープラスミドpMAL-cRI (New England Biolabs社製) のBamHI切断部位に挿入して、組換えヒトL-FABP融合蛋白質発現のためのプラスミドpMAL/L-FABPを得た。pMAL/L-FABPは、ベクターに由来するMBP (maltose binding protein) のコーディング配列とジャンクション配列に続いて、ヒトL-FABP cDNAが正方向に挿入されており、MBP、ジャンクション配列及びヒトL-FABPからなる融合蛋白質をコードしている。

【0059】

このプラスミドpMAL/L-FABPを市販の形質転換用宿主大腸菌JM109株 (Yanisch-Perron, C.ら、Gene、第33巻、第103-119頁、1985年) (東洋紡績(株)社製) に導入し、アンピシリン耐性となった形質転換株を、IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactoside) を途中添加したLB培地中にて培養した。

【0060】

得られた菌体を超音波破碎し、菌体抽出液を5mM Tris-HCl pH8.5で透析した。これを陰イオン交換カラム (RESOURCE Q 6ml、ファルマシア社製) を用いて、300mM NaClまでの直線的濃度勾配で溶出して分画し、ANS結合活性を示す画分を回収した。これをセントリプレップ (アミコン社製) で限外ろ過して濃縮した後、ゲルろ過カラム (Superdex75pg、ファルマシア社製) を用いて分画し、ANS結合活性を示す画分を、ヒトL-FABP融合蛋白質として回収した。このヒトL-FABP融合蛋白質に、Factor Xa (New England Biolabs社製) を重量比で1/100量加え、室温で一晩反応させて、酵素的に限定分解した。酵素処理後の反応液を再度ゲルろ過で分離し、ANS結合活性を示す約14キロダルトンの画分を、組換えヒトL-FABPとして回収した。得られた精製蛋白質をSDS-ポリアクリルアミド電気泳動に供し、シルバー染色したところ、単一バンドとなっていた。

【0061】

かくして得られた精製組換えヒトL-FABPについて、アミノ酸シークエンサーでアミノ酸配列を調べた。その結果、そのN末端アミノ酸配列には、ベクターのジャンクション配列に由来する6アミノ酸残基(Ile Ser Glu Phe Gly Ser)の配列に続いて、既報のヒトL-FABPのN末端領域と一致する14アミノ酸残基の配列が存在することが確認できた。

【0062】

(2) 抗ヒトL-FABPポリクローナル抗体の調製

前項(1)で得られた精製組換えヒトL-FABPを抗原として用い、前記実施例1の(1)項記載の方法と同様にしてウサギを免疫し、抗ヒトL-FABP抗血清から抗ヒトL-FABPポリクローナル抗体(IgG)を得る。

【0063】

実施例3 ヒト腎組織(正常腎組織)におけるFABPの局在

正常なヒト腎臓組織について、FABPの免疫組織染色を行った。ヒト腎臓組織は、腎癌患者から摘出された腎臓の中の正常な組織部位を用いた。L-FABPの染色のための一次抗体としては、前記実施例1の(1)と同様にして調製した抗マウスL-FABPポリクローナル抗体(IgG)を用い、H-FABPの染色のための一次抗体としては、前記実施例1の(2)と同様にして調製した抗マウスH-FABPポリクローナル抗体(IgG)を用いた。免疫染色は、ベクタステインABCキット(ベクターラボラトリー社製)を用いて行い、二次抗体はビオチン標識抗ウサギIgGを用い、酵素はビオチン標識ワサビペルオキシダーゼを、発色基質はDAB(3, 3'-ジアミノベンシジン四塩酸塩)を各々用いた。

【0064】

その結果、図1に示したように、抗L-FABP抗体を用いた場合、近位尿細管が染色された。一方、抗H-FABP抗体を用いた場合、主に遠位尿細管が染色され、近位尿細管においても弱い染色が認められた。糸球体はいずれの抗体を用いても染色されなかった。

【0065】

これらのことから、正常腎組織において、L-FABPは近位尿細管に存在し、H-FABPは主として遠位尿細管に存在することが確認できた。

【0066】

実施例4 腎疾患患者の腎組織におけるFABPの検出

IgA腎症と診断され、ステロイド治療に対し抵抗性を示した2名の患者（患者1及び患者2）から腎生検により採取された腎組織サンプルについて、L-FABPの免疫組織染色を行った。患者1は予後不良であり、腎生検から5年後に腎不全に陥り人工透析が必要となった症例である。一方、患者2は予後良好であり、腎生検後寛解した症例である。

【0067】

免疫組織染色は、前記実施例3と同様にして、一次抗体として抗マウスL-FABPポリクローナル抗体（IgG）を用いて行った。その結果、図2に示したように、患者2の腎組織では近位尿細管が全体的に染色されており、L-FABPの発現が明確に認められた。これに対し、患者1の腎組織では染色性が顕著に落ちており、L-FABPの発現がほとんど認められなかった。

【0068】

これらの結果から、腎組織におけるL-FABPの発現量と腎疾患の予後の良好性とは相関関係があり、腎組織中のL-FABPを検出することにより、腎疾患の予後不良のリスクを診断することが可能であることがわかる。

【0069】

実施例5 腎疾患患者の尿中のFABPの検出

腎疾患患者（34例）から採取した尿サンプルについて、尿中に漏出しているL-FABP量をサンドイッチELISA法により以下のように測定した。すなわち、予め抗マウスL-FABPポリクローナル抗体（IgG）をプレートに固相化し、尿サンプルを加え、一定時間静置後洗浄した。これに、ビオチンで標識した抗マウスL-FABPポリクローナル抗体（IgG）を加え、洗浄後、市販のアビジン-ビオチン検出キット（フナコシ社製、ABC-P0 kit）を用いて検出を行い吸光度を測定した。

【0070】

また、同尿サンプルについて、漏出NAG（N-アセチル- β -D-グルコサミニダーゼ）の量も測定した。NAGは腎組織細胞中に存在するマーカー酵素であり、尿中に漏出したNAG量は一般的に腎組織の傷害の指標とされている。尿中のNAG量は、文献（日本臨床、第43巻、秋季臨時増刊号、第234-236頁、1985年）記載の方法に準じて測定した。

【0071】

各サンプルの測定結果について解析するため、縦横各座標軸に各々L-FABP量及びNAG量をとってグラフにプロットした。その結果、一般的な症例では、漏出NAG量と漏出L-FABP量の値には正の相関が見られた。しかし、いくつかの症例（典型例約5例）を含むグループでは、漏出NAG量が高い（すなわち組織傷害は大きい）のにもかかわらず、漏出L-FABP量は低値を示していた。このグループでは、腎組織中におけるL-FABPの発現量が低いと考えられ、従ってこのグループは予後不良のリスクの高いグループであることが考えられる。

【0072】

実施例6 ウサギ腎組織由来のFABPの精製

ウサギを脱血死させた後摘出した腎臓から、前記実施例1の（1）項記載の方法に準じてFABPを精製した。すなわち、腎臓をホモジナイズした後、遠心分離及び超遠心により得られた細胞質分画について、ゲル濾過カラム（Superdex 75pg、ファルマシア社製）を用いて分画し、ANS結合活性を指標として分子量10~20キロダルトンのフラクションを回収した。これを30mM Tris-HCl（pH 7.5）で透析した後、陰イオン交換カラム（RESOURCE Q、ファルマシア社製）を用いて300mM NaClまでの直線的濃度勾配で溶出し、ANS結合活性を示す画分をFABPとして回収した。NaCl濃度0mMおよび60mMにANS結合活性を示すピークが見られた。

【0073】

前記実施例1で得られた抗マウスL-FABP抗体ならびに抗マウスH-FABP抗体を用いて、ウェスタンブロッティングを行った。その結果、NaCl濃度0mM

のピークに含まれる蛋白質は、抗マウスL-FABP抗体と交差反応し、ウサギL-FABPであると考えられた。また、NaCl濃度60mMのピークに含まれる蛋白質は抗マウスH-FABP抗体と交差反応し、ウサギH-FABPであると考えられた。また、これらのことから、ウサギ腎臓組織には、ヒト腎臓組織と同様に、L-FABPとH-FABPの少なくとも二種類のFABPが存在することがわかった。

【0074】

実施例7 腎炎モデルマウスにおける解析

(1) 腎炎モデルマウスの作製

加速型抗GBM腎炎モデルマウスの作製を、Nagaiらの文献(Jpn.J.Pharmacol., 第32巻、第1117-1124頁、1982年)記載の方法に準じ、以下のようにして行った。マウスの糸球体基底膜(GBM: glomerular basal membrane)を抗原としてウサギを免疫し、抗血清(NTS: nephrotoxic serum)を調製した。得られたNTSを、マウスに投与し、抗GBM腎炎モデルマウスを作製した。GBMの調製は、Nagaiらの文献(Jpn.J.Pharmacol., 第32巻、第1117-1124頁、1982年)記載の方法に準じて行った。

【0075】

(2) 腎炎モデルマウスの尿中蛋白質の解析

上記(1)項にて作製した加速型抗GBM腎炎モデルマウス及び正常マウスの尿について、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行いシルバー染色して、尿中蛋白質を比較した。その結果は図3に示す通りであり、腎炎モデルマウスでは、NTS投与後7日目で既に、分子量67キロダルトン付近のメインバンド(アルブミンと考えられる)を含む多数の濃い蛋白質バンドが見られ、いわゆる高度蛋白尿の症状が認められた。また、正常マウスにおいては、約17キロダルトンの明瞭なバンドが見られたのに対して、腎炎モデルマウスでは、これが著名に減少しているのが観察された。

【0076】

尿中蛋白質のほとんどは、血清中の蛋白質が糸球体基底膜のバリアーを越えて漏出してきたものである。しかし、この蛋白質のように、高度蛋白尿の状態

逆に正常状態での尿中存在量より存在量が減少するということは、この蛋白質が、単なる漏出蛋白ではなく、腎機能異常との関係において何か特別な役割を担っていると考えられる。

【0077】

次に、以下のようにして、この約17キロダルトンの蛋白質を精製した。すなわち、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行いクマシーブリリアントブルーで染色したゲルから、約17キロダルトンのバンドを切り出し、そのゲル片を透析膜に入れた。水平型電気泳動装置を用いて、染色されたバンドがゲルから完全に抜けるまで泳動し、溶出液を回収し、限外濾過にて濃縮した。

【0078】

得られた精製蛋白質について、アミノ酸シーケンサーを用いて、N末端側アミノ酸配列の決定を行った。決定した15残基の配列をもとに、既知蛋白質のアミノ酸配列とのホモロジー検索を行ったところ、この蛋白質は α_{2U} -グロブリン (Major Urinary Proteinとも称される) (データベース名: SWISS-PROT、登録番号: P02762) と相同であった。

【0079】

α_{2U} -グロブリンは、雄性ラット、マウスに特異的な主要尿中蛋白質として知られている。 α_{2U} -グロブリンは、肝臓で合成されて血中に放出された後、腎臓を經由して尿中に排出されるが、その際一部が腎臓の尿細管細胞内に再吸収され、細胞内でプロセッシングを受けて腎型FABP (K-FABP) に変換されることが考えられている。

【0080】

(3) 腎炎モデルマウスの腎組織におけるFABP (K-FABP) の検出

加速型抗GBM腎炎モデルマウスについて、腎組織でのK-FABPの増減と腎組織傷害との関係を、免疫組織染色を用いて解析した。

【0081】

ラットにおいて、 α_{2U} -グロブリン (180アミノ酸残基、約20キロダルトン) の少なくともN末端側9アミノ酸残基が欠失してK-FABP (約15キロダルトン) となることが知られている。

【0082】

そこで、K-F A B Pの免疫染色に用いる抗体としては、市販のヤギ抗マウス α_{2U} -グロブリン抗血清（ノルディック社製、Anti Major Urinary Protein Ab）を用いた。

【0083】

腎組織におけるK-F A B Pの免疫組織染色は、ベクタステインABC キット（ベクターラボラトリー社製）を用い、以下のように行った。すなわち、マウス腎臓から厚さ3 μ mの腎臓パラフィン切片を調製した後、脱パラフィン操作を行った。これを、0.05% Tween 20を含む生理的リン酸緩衝液（pH7.4）（以下、PBST）にて軽く洗浄した後、0.5% 過酸化水素を含むメタノール中にて30分間固定し、PBSTで軽く洗浄した後、マーキングを行った。これをPBSTで洗浄（5分×2回）した後、正常ヤギ血清を含むPBS中60分間ブロッキングを行い、さらに、一次抗体として抗マウス α_{2U} -グロブリン抗血清を含むPBS中にて一夜反応させた。これをPBSTで洗浄（5分×3回、以下同様）した後、二次抗体として ビオチン標識した抗ウサギIgG抗体（ベクターラボラトリー社製）を含むPBS中にて45分間反応させた。これをPBSTで洗浄した後、ストレプトアビジンとビオチン標識ペルオキシダーゼを含む溶液（ベクターラボラトリー社製）中45分間反応させ、再度PBSTで洗浄した後、発色基質DABとH₂O₂を含むPBST中で発色させた。これを適宜、検鏡し、蒸留水による水洗にて反応を停止した。

【0084】

前記のようにして免疫染色した組織切片をさらに、ヘマトキシリン染色して、核を染色した。蒸留水で洗浄後、常法により脱水、透徹および封入を行った。

【0085】

膠原線維を染色するアザン染色は、前記と同様にして調製したマウス腎臓パラフィン切片について、Ishikawaらの文献（Medical Technology、第19巻、第176-177頁、1991年）記載の方法に準じ、以下のように行った。すなわち、パラフィン切片の脱パラフィン操作を行った後、10%重クロム酸カリウム／10%トリクロル酢酸等量混合液中にて、20分間媒染し 蒸留水水洗（5分間）した後、0.8

%オレンジG水溶液中10分間浸漬した。蒸留水水洗（約10秒間、以下同）の後、アソカルミンG液中60分間浸漬し、蒸留水水洗の後、アニリン・アルコール中で3秒間浸漬して分別した。蒸留水水洗した後、酢酸アルコール中で1分間処理し、蒸留水水洗した後、さらに2.5%リンタングステン酸溶液中20分間処理した。これを蒸留水水洗した後、アニリン青/オレンジG混合液中で20～60分間、鏡検しながら染色した。染色後水洗し、脱水、透徹および封入を行った。

【0086】

前項（1）及び（2）と同様にして作製し、尿中蛋白質を解析した加速型抗GBM腎炎モデルマウス及び正常マウスの腎臓組織切片について、K-FABPの免疫染色を行った。その結果、図4に示した通り、正常マウスの腎臓組織の近位尿細管において、抗 α_{2U} -グロブリン抗体によって認識される蛋白質の存在が明確に認められ、これは α_{2U} -グロブリンから生成されたK-FABPであると考えられた。一方、尿中で α_{2U} -グロブリンが減少しているNTS投与後42日目のマウスでは、この腎臓組織近位尿細管のK-FABPも正常マウスと比べて顕著に減少していた。

【0087】

また、間質線維化の進行度をみるために同様の腎臓組織切片についてアザン染色を行ったところ、近位尿細管のK-FABP減少が確認されたNTS投与後42日目のマウスでは、線維化部位はわずかに見られるだけであったが、84日目では線維化部位が著明に増大していた。

【0088】

これらの結果から、尿中 α_{2U} -グロブリンの減少、及び腎臓組織中のK-FABPの減少は、間質線維化に先行して起こり、腎障害の予後を予知するための指標となることがわかった。

【0089】

また、尿中で α_{2U} -グロブリンが減少している腎炎マウスでK-FABPも減少していたことから、尿中の α_{2U} -グロブリンの減少は、近位尿細管での再吸収の亢進によるものではなく、肝臓での α_{2U} -グロブリン産生が抑制されているのではないかと考えられた。

【0090】

【発明の効果】

本発明の方法によれば、従来困難であった腎疾患の予後等の診断のために、非常に有用な情報となる検査結果を得ることができる。従って本発明の方法によって得られる検査結果をもとに、予後に関するリスクに応じた適切な治療方法を選択することも可能となる。また、本発明の方法は、腎組織サンプルの他、尿サンプルにも適用することが可能なので、簡便で効率よく検査を行うことができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】 正常ヒト腎組織におけるFABPの免疫染色結果を示した組織切片の写真。

【図2】 IgA腎症患者の腎組織におけるL-FABPの免疫染色結果を示した組織切片の写真。

【図3】 正常及び腎炎マウスにおける尿中蛋白質の解析結果を示したSDS-ポリアクリルアミド電気泳動の写真。

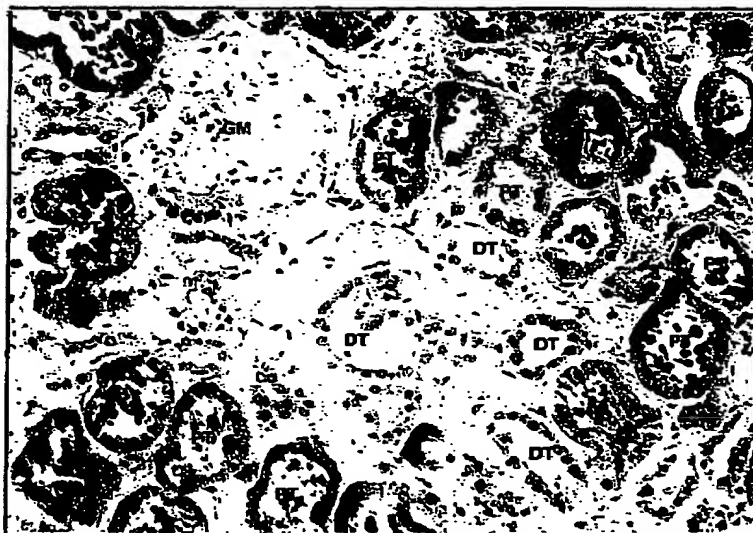
【図4】 正常及び腎炎マウスの腎組織におけるK-FABPの免疫染色結果を示した組織切片の写真。

【書類名】 図面

【図1】

【図1】

A
L-FABP



B
H-FABP

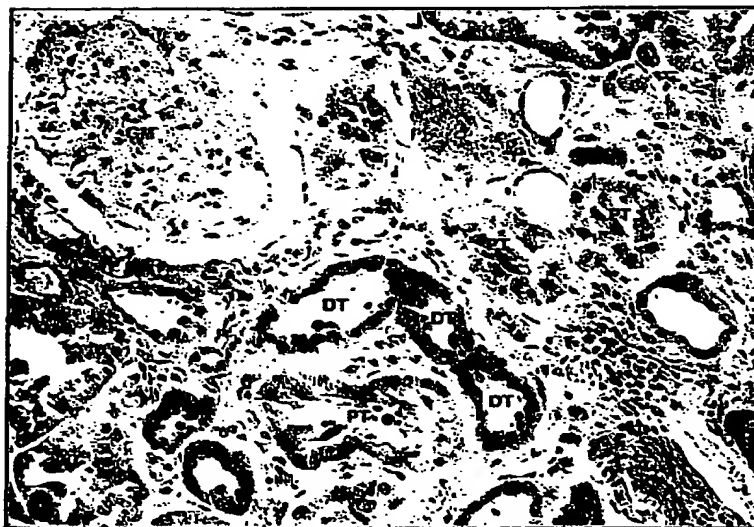
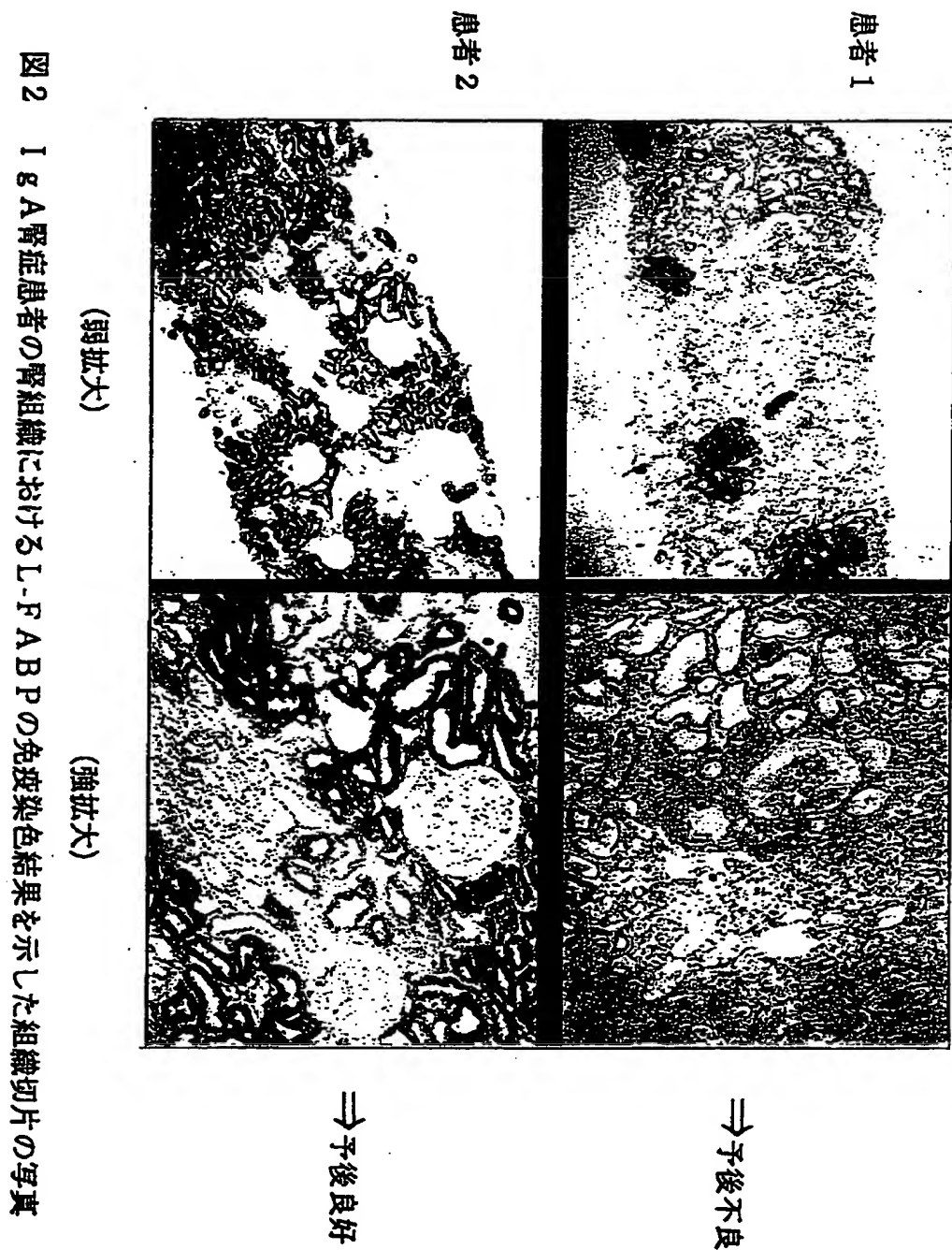


図1 正常ヒト腎組織におけるFABPの免疫染色結果を示した組織切片の写真

A: 抗L-FABP抗体による染色
B: 抗H-FABP抗体による染色
PT: 近位尿細管
DT: 遠位尿細管
GM: 糸球体

【図2】

【図2】



【図3】

【図3】

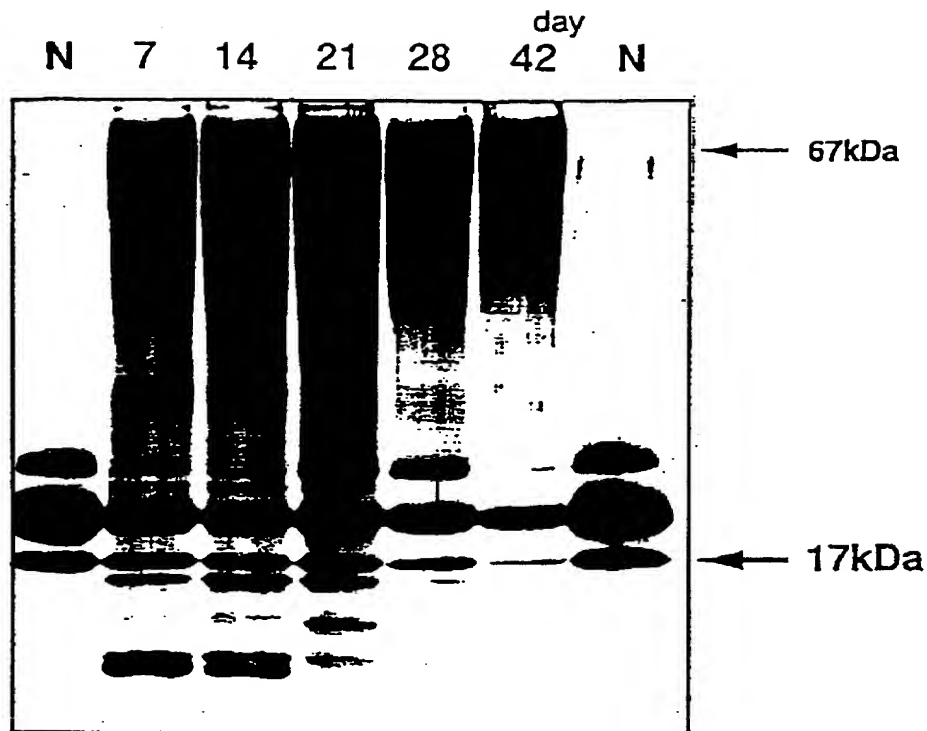


図3 正常及び腎炎マウスにおける尿中蛋白質の解析結果を示した
SDS-ポリアクリルアミド電気泳動の写真
N：正常マウス
7, 14, 21, 28, 42：腎炎モデルマウス、NTS投与後の
日数

【図4】

【図4】



A



B

図4 正常及び腎炎マウスの腎組織におけるK-FABPの免疫染色結果を示した組織切片の写真

A: 正常マウス

B: 腎炎モデルマウス、NTS投与後42日目

【書類名】 要約書

【課題】 本発明の目的は、新規で有用な腎疾患の診断方法、検査方法を提供することにある。

【解決手段】 ゲッ歯類以外の哺乳動物から採取した被検試料中に存在する、腎臓組織由来の脂肪酸結合蛋白質を検出することを特徴とする、腎疾患の検査方法。前記検査方法のための検査用試薬又はキット。

【書類名】
【訂正書類】

職権訂正データ
特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】

000002956

【住所又は居所】

大阪府大阪市中央区道修町3丁目2番10号

【氏名又は名称】

田辺製薬株式会社

【代理人】

申請人

【識別番号】

100076923

【住所又は居所】

大阪府大阪市淀川区加島3-16-89 田辺製薬
株式会社内

【氏名又は名称】

箕浦 繁夫

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000002956]

1. 変更年月日 1990年 9月20日

[変更理由] 新規登録

住 所 大阪府大阪市中央区道修町3丁目2番10号

氏 名 田辺製薬株式会社